

# Identificación de circovirus porcino tipo 2 (PCV2) por una PCR semi - anidada en cerdos (*Sus scrofa domestica*) con lesiones compatibles con enfermedad asociada al PCV2 (PCVAD)

Identification Type 2 Porcine Circovirus (PCV2) Using Semi-Nested PCR in Pigs (*Sus scrofa domestica*) with Lesions Compatible to PCV2 Associated Disease (PCVAD)

**Saldivia J., Bastidas Z., Perazzo Y., Pargas L., Rivero J., López J.A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio de Virología Animal. Decanato de Ciencias Veterinarias. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". 3023 Cabudare. [joseagustinlopez@ucla.edu.ve](mailto:joseagustinlopez@ucla.edu.ve)

## RESUMEN

Diferentes enfermedades se han asociado a infecciones por circovirus porcino tipo 2 (PCV2), llamadas PCVAD (por sus siglas en inglés). La familia Circoviridae, son virus de 17nm de diámetro, genoma circular y sus diferencias genéticas permiten dividirlo en genotipos 1 y 2. PCV2 fue descrito en Canadá en asociación al síndrome de emaciación post-destete de los cerdos (PMWS) y posteriormente reportado como enfermedad emergente en granjas de cerdos de todo el mundo. En Venezuela esta enfermedad fue diagnosticada en granjas del estado Carabobo en el año 2003 y en el 2010 se reportó la primera caracterización de los genotipos circulantes. Con la finalidad de detectar PCV2 en una PCR semi-anidada de animales in vivo, se procesaron 36 muestras de sangre completa y tejidos (ganglios linfáticos, pulmón, riñón, hígado y corazón) embebidos en parafina obtenidas de cerdos beneficiados en un matadero del estado Lara. Para determinar la heterogeneidad genética de estos virus, los amplicones fueron secuenciados y analizados en su homología. Todas las muestras (sangre y tejidos) de cerdos con síntomas a PCVAD (36/36) resultaron positivas por PCR. Al dibujar los árboles filogenéticos comparando las secuencias obtenidas de las muestras positivas con secuencias reportadas para diferentes genotipos de PCV en el GenBank, se encontró que en las muestras de sangre analizadas circulan los subgenotipos 1 A/B y 2E de PCV2. Este estudio aporta una metodología para detección y caracterización del Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV 2) en Venezuela, sin necesidad de realizar necropsia en los animales sospechosos a PCVAD.

Palabras clave: Circovirus tipo 2, genotipos, cerdo, PCVAD.

## ABSTRACT

Different diseases have been associated with infection with porcine circovirus type 2 (PCV2) PCVAD calls. The family Circoviridae, are viruses of 17 nm in diameter, circular genome and genetic differences that allow split into two genetic groups: group 1 and 2. PCV2 was first described in Canada in association postweaning multisystemic wasting syndrome o PMWS in pigs (PMWS) and subsequently reported as emerging disease in swine farms all over the world. In Venezuela the disease was diagnosed in Carabobo state farms in 2003 and in 2010 reported the first study to characterize genotypes circulating in Venezuela. In order to detect PCV2 in a semi-nested PCR in vivo animal were processed whole blood 36 samples and paraffin-embedded tissue (lymph nodes, lung, kidney, liver and heart) obtained from pigs for slaughter benefit in Lara state. To determine the genetic heterogeneity of these viruses, the amplicons were sequenced and analyzed in their homology. All blood and tissue samples from pigs with symptoms PCVAD (36/36) were positive by PCR. When drawing phylogenetic trees obtained by comparing sequences of positive samples for different genotypes sequences reported in GenBank PCV was found that in the analyzed blood samples from pigs for slaughter arriving circulating subgenotypes 1 A / B and 2E of PCV2. This study provides a methodology for detection and characterization of Porcine Circovirus Type 2 (PCV 2) in Venezuela, without necropsy in animals suspected to PCVAD.

Key words: Type 2 circovirus, genotypes, pig, PCVAD.

## INTRODUCCIÓN

Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2) es un virus emergente del que se desconocen todavía muchos aspectos epidemiológicos y patogénicos. Los PCV2 se han identificados como los principales causantes del Síndrome Multisistémico de Adelgazamiento Posdestete (en inglés postweaning multisystemic wasting syndrome o PMWS) y el síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS). Estos síndromes, descrito por primera vez en cerdos canadienses y franceses [1], se caracterizan clínicamente por adelgazamiento y deterioro de la salud del lechón. La etiología viral de estos síndromes (PMWS y PDNS) fue determinada a través de la detección de ácidos nucleicos y antígenos del circovirus porcino tipo 2 (PCV2) en lesiones de cerdos afectados [1]. Estos síndromes se les conocen como enfermedades asociadas a circovirus porcino (Porcine Circovirus Associated Diseases, PCVAD).

El diagnóstico de las PCVAD, se fundamenta en la presencia de signos clínicos, lesiones microscópicas en los tejidos estudiados y la detección del ADN de PCV2 en las lesiones. Los primeros hallazgos fueron observados en lechones destetados entre 3 y 6 semanas de edad [2], sin embargo, los reportes en EUA reflejan las pérdidas por PCVAD en cerdos entre 10 y 20 semanas de edad [3]. La mayoría de las veces se han reportado mortalidad entre el 5 y el 20% [2].

PCV2 está ampliamente distribuido en cerdos de todo el mundo, análisis retrospectivos de sueros desde 1969 han mostrado la presencia de anticuerpos frente a PCV2 en un porcentaje elevado de los sueros analizados [4,5,6]. Análisis retrospectivos de secciones de tejidos de cerdos enfermos, mostraron que hubo casos esporádicos de PMWS clásico en 1986 [4]. Existen crecientes evidencias de que PCV2 juega un papel importante en otros síndromes que afectan al cerdo, incluyendo la neumonía proliferativa necrotizante [7,8], problemas reproductivos en cerdas gestantes y el síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (PDNS) [7], lo que atribuye gran importancia a su estudio.

Actualmente hay relativamente pocos laboratorios en el mundo que sean capaces de detectar PCV2 en tejidos procedentes de lesiones, y hay pocos datos publicados sobre estudios que hayan investigado la prevalencia de co-infecciones con PCV2 en casos de patología porcina [8]. En Venezuela, aunque veterinarios de campo habían observado síntomas de PCVAD en granjas y en cerdos que llegan a mataderos, el agente etiológico no se había podido verificar debido a las limitaciones técnicas de los laboratorios de diagnóstico. Sogbe y col. 2003, estudiaron lechones de granjas del estado Carabobo que presentaban lesiones compatibles a PMWS, y al relacionar los

aspectos clínicos, histopatológicos y de hibridación in situ se evidenció el incremento de ácidos nucleicos de PCV2, lo cual confirmó la presencia de PMWS por primera vez en granjas porcinas de Venezuela [9]. Sin embargo, el reporte de PCV2 como agente causal de los casos de PCVAD en granjas venezolanas se logró hasta el año 2010, con la descripción de los genotipos virales de PCV2 circulantes en tres estados venezolanos [10].

El objetivo de esta investigación fue detectar mediante una PCR semi-anidada ADN de PCV2 en muestras de sangre completa de animales sintomáticos con PCVAD, sin la necesidad de recurrir al sacrificio de los mismos; además determinar la heterogeneidad genética de estos virus por medio de la secuenciación y el estudio de la homología de los ácidos nucleicos.

## MATERIALES Y METODOS.

**Muestra:** Se seleccionaron 36 cerdos que presentaron síntomas compatibles con PMWS en el matadero del estado Lara. A los animales se les recolectó 5 ml de sangre completa y tejidos (ganglios linfáticos, pulmón, riñón, hígado y corazón) en formol al 10%. Las muestras de sangre completa se utilizaron para la extracción de ADN total en el Laboratorio de Virología del Decanato de Ciencias Veterinarias (DCV) de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA), y las muestras en formol fueron enviadas al laboratorio de patología para el diagnóstico histopatológico.

**Extracción de ADN genómico:** De las muestras enviadas al diagnóstico histopatológico se obtuvieron láminas de tejido embebido en parafina, a las cuales se les realizó extracción del ADN viral según Hamel y col. [11] modificado. Las muestras fueron congeladas con nitrógeno líquido y posteriormente incubadas a 65°C durante toda la noche con 10µl de Betamercaptoetanol (1,6%) y 0,5 µl de Proteinase K (20 mg/ml reconstituido en 50mM tris-HCL pH 8.0, 10 mM CaCl<sub>2</sub>). Se incubó 10 minutos a 65°C con 10% de CTAB y se ajustó el pH con NaCl 5 M, mezclado por inversión con igual volumen de SEVAG (Cloroformo: alcohol Isoamílico, 24:1) e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó por 10 minutos a 12000 x g y la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, con 20µl de NaOA 3 M e Isopropanol, y se centrifugó a 12000 x g por 2 minutos. Al pellet seco se le añadió 300µl de agua bidestilada y 1µl de RNase, e incubó durante 15 minutos a 65 °C en baño de maría. Para luego precipitar el ADN con 3 volúmenes de etanol 100% a -40°C durante toda la noche. Después se centrifugó a 12000 x g durante 5 minutos, se lavó con 1 ml de etanol al 70 % en agua bidestilada, y nuevamente se centrifugó 2 minutos a 12000 x g. Para

hidratar el ADN extraído se agregó 50 µl de agua libre de nucleasas, se incubó a 65 °C en baño de maría durante 1 hora y se congeló hasta su uso.

A las muestras de sangre completa se les extrajo en ADN utilizando el estuche comercial DNA genomic de Promega (Promega Inc. USA), y siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza del ADN fue verificado por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio (5 µg/ml).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): La detección de PCV2 se realizó por una PCR semi anidada del ADN viral extraído de tejido de ganglio linfático de las muestras colectadas. Los amplicones se obtuvieron usando cebadores de la regiones conservadas del ORF2 del PCV2: llamado CV4-F 5' - CTCGGCAGCGTCAGTGA AAAA - 3' (800 a 819) para el cebador sentido, CV5-R 5' - AAATTACGGGCCCACTGGCT - 3' (1350 a 1369) para el cebador anti- sentido, y CV6-Int 5' - CCTTCCGAGGAGGAGAGAAAAC - 3' (879 a 900) como cebador interno de la PCR semi-anidada, junto al cebador anti-sentido, para un tamaño de banda esperado de 469 pb, aproximadamente. Ambos ciclos de PCR se llevaron a cabo utilizando la mezcla del kit comercial PCR Master Mix® (Corporación PROMEGA, USA) optimizada para ser usada con los cebadores. El volumen final de la mezcla fue 25 µl, conteniendo: 12.5 µl de PCR Master Mix®, 2x (Taq DNA Polimerasa; dATP, dGTP, dCTP, dTTP; MgCl<sub>2</sub>); 2.5 µl de cebador sentido 10 µM; 2.5 µl de cebador anti-sentido 10 µM; 5 µl de ADN genómico (50 ng aproximadamente); y 2.5 µl de agua libre de nucleasas. Estas mezclas se sometieron a 94°C por 2 min de desnaturalización y 40 ciclos de 94°C por 30 seg., 60°C por 30 seg. y 72°C por 30 seg., finalizando con 10 min a 72°C de extensión final, todo esto en un termociclador MasterCycler® Ep (Eppendorf, Hamburgo-Alemania).

Los productos de la amplificación fueron identificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, empleando una cámara Fisher Biotech Modelo FB-SB-710, en búfer de corrida TAE 1 X (48.4g Tris, 7.4gEDTA, 11.4 ml de ácido acético) más 5 µg/ml Bromuro de Etidio. Se mezcló 1 µl de búfer de carga (Blue / Orange 6x Loading Dye 15% Ficoll® 400, 0.03% azul de bromofenol, 0.03% xylene cyanol FF, 0.4% Orange G, 10mM Tris-HC pH 7,5 y 50mM EDTA) con 4µl de cada amplificado. Los pozos se cargaron con 5 µl de los amplificados utilizando un marcador de peso molecular (Ladder ADN 100bp en 10mM Tris-HCL pH 7.5, 1mM EDTA) para identificar su tamaño. La corrida fue llevada a cabo con voltaje constante a 100 V, por un tiempo de 45 minutos. Para la observación de los amplicones se observó el gel en un trasiluminador de luz UV (UVC, High Performance).

Secuenciación y análisis de secuencias: Los

amplicones obtenidos fueron purificados utilizando el Wizard® PCR Prep (Corporación PROMEGA, USA) y preparados para su secuenciación según instrucciones del Centro de Secuenciación y Procesamiento de Ácidos Nucleicos (CeSAAN) del instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) (Altos de Pipe, Edo Miranda, Venezuela), donde se realizó la secuenciación de los ácidos nucleídos en forma automatizada de los amplicones de PCV2 detectados.

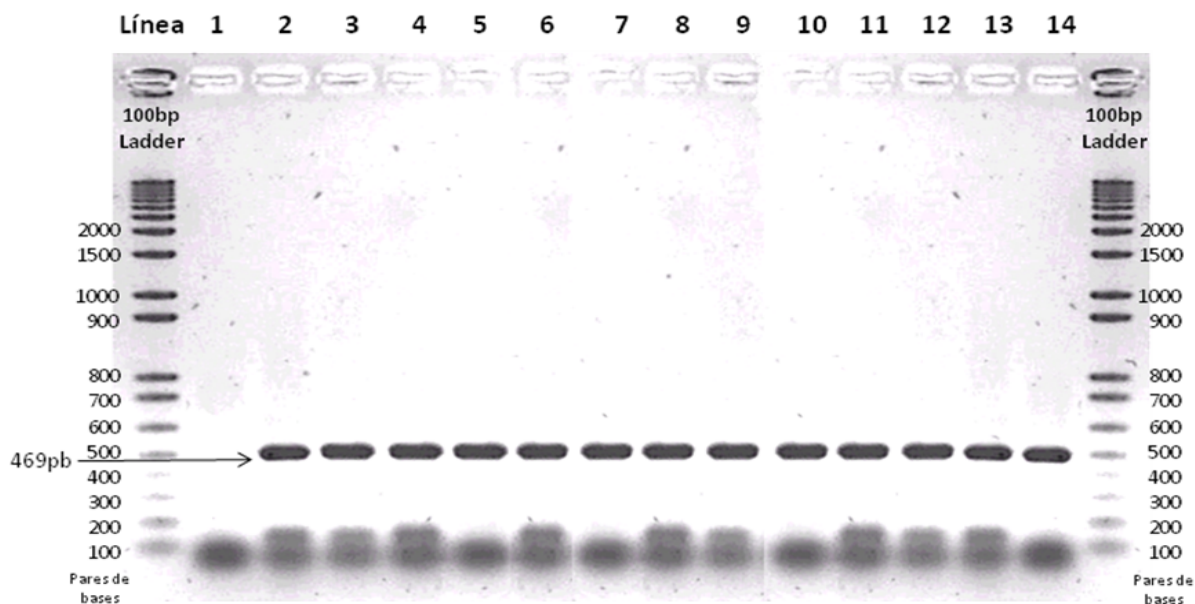
Está secuenciación se realizó en el sistema ABI 3130XL genetics de Perkin Elmer utilizando los cebadores CV6 Int 5' - CCTTCCGAGGAGGAGAGAAAAC - 3' (879 a 900) y CV5 R 5' - AAATTACGGGCCCACTGGCT - 3' (1350 a 1369). Para las reacciones de secuencia se utilizó el "Big Dye Terminador Cyler Sequencing- Ready Reaccion Kit" de la misma compañía. El análisis fue realizado comparando las secuencias obtenidas con las secuencias del ORF2 de diferentes PCV2 reportados en una base de datos pública (GenBank). Esta comparación se realizó por alineamiento de secuencias con el programa CLUSTAL W (FENNA- Doolittle y Thompson). La comparación en la homología y las distancias fueron calculadas con el método de Kimura - 2 parámetros de distancias, construyendo los árboles filogenéticos por el método de inferencia Neighbour joining. Todo esto se realizó con ayuda del programa DNAMAN®. La significancia estadística del árbol construido fue estimada aplicando un bootstrap (técnica bioinformática de re-muestreo) de 1500 réplicas.

## RESULTADOS

Se procesaron 36 muestras de ganglios linfáticos, obtenidos de cerdos que presentaron sintomatología compatible a PCVAD (desmedro o lesiones cutáneas evidentes) y muestras de sangre completa de estos cerdos. Todas las muestras presentaron al estudio histopatológico: exudado celular con predominio de linfocitos peri-bronquiales, en pulmón; necrosis focal con linfocitos en forma difusa y escasa, en el hígado; reacción perivascular mononuclear, en piel y necrosis en centros germinales (linfadenitis aguda necrótica), en nódulos linfoides. Estas lesiones son compatibles con los reportes histopatológicos descritos para PMWS y PDNS, ambas PCVAD.

Las muestras de ganglios linfáticos de los 36 cerdos resultaron positivas a PCV2 por el PCR semi-anidado específico para la región ORF 2 de circovirus. Este resultado demuestra que las lesiones encontradas en los tejidos, específicamente en los ganglios linfáticos son causados por el PCV2. En la figura 1, se muestran 8 de las muestras de sangre y 5 de tejidos embebidos en parafina procesadas por PCR, con bandas esperadas de 469pb, correspondiente a toda la región ORF del

**Figura 1.** PCR semi-anidada para la región ORF2 PCV2. En el gel se muestran los diferentes amplicones obtenidos por PCR de las muestras de sangre completa (líneas 2 al 9) y ganglio linfático (línea 10 al 14), como bandas de aproximadamente 469 pb correspondientes al tamaño de banda esperado con los cebadores usados. En líneas 1 se muestra el control negativo de la PCR y en las líneas de los extremos colocó el marcador de peso molecular 100pb Ladder® (Corporación PROMEGA, USA), cargando el gel con 5 µl de cada muestra.



PCV2. No se observaron en esta PCR bandas inespecíficas ni falsos positivos.

En la figura 2, se representan las secuencias obtenidas de los amplicones positivos a PCV2. En el análisis filogenético incluyeron 24 muestras que presentaron secuencias completas para el ORF2 del PCV2, para evitar distorsiones en la comparación de homologías. Los amplicones que presentaron secuencias incompletas (12 muestras), fueron comparadas en sus secuencias y mostraron homología del 100% con PCV2 para cada fragmento comparado. La mayoría de las muestras (19) se agrupan con las secuencias consenso para el genotipo 2E en un 99%, y cinco (5) de las muestras se agrupan en un 96% con la secuencia consenso para el genotipo 1 A/B.

## DISCUSIÓN

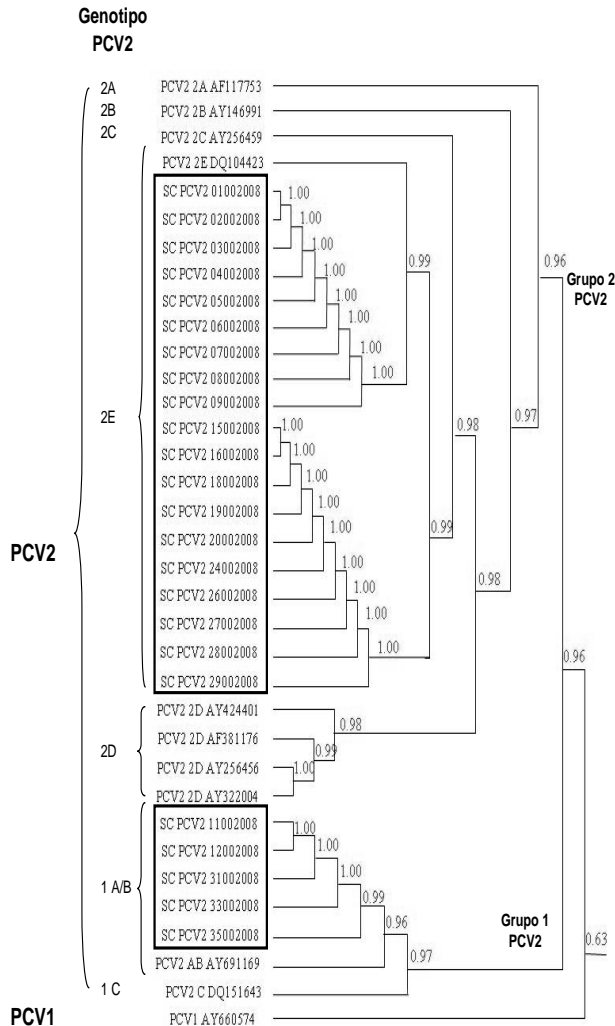
Al comparar los resultados de la PCR semi anidada de ADN de tejidos embebidos en parafina y ADN extraído de las muestras de sangre, se comprobó la utilidad de esta técnica, al encontrarse amplicones de PCV2 en todas (36/36) las muestras de sangre procesadas. Diferentes resultados indican que la PCR para los ganglios linfáticos inguinales superficiales es el método más sensible para detectar la infección por PCV2 [12]. Sin embargo, las muestras de sangre son más convenientes para los estudios epidemiológicos, ya que las muestras disponibles proceden de animales

vivos. Además, la PCR a partir de sangre completa o suero sanguíneo, es más sensible que la detección de PCV2 en tejidos mediante el uso de hibridación in situ, usada para el diagnóstico de PCV. La alta concordancia entre los resultados, usando suero y la detección desde ganglio linfático, sugiere que la viremia y la presencia del virus en el tejido se producen de forma concomitante en la mayoría de los casos. Esto indica que la viremia puede durar tanto como la presencia del virus en tejidos linfoides, por lo cual una técnica basada en la detección del virus en la sangre puede ser más sensible en el caso de infecciones por PCV2, en los cerdos.

Es importante resaltar que la detección del virus no es equivalente a la existencia de PCVAD. Distintos estudios epidemiológicos realizados en países como Francia, UK y España, han demostrado que es posible encontrar numerosas explotaciones con un alto porcentaje de animales positivos a virus y/o anticuerpos frente a PCV2 sin evidencia de signos clínicos o lesiones 3, 4. Por ello, la interpretación de resultados de laboratorio debe ser evaluada cuidadosamente, ya que ni la presencia de virus en sangre, ni la presencia de anticuerpos específicos frente a circovirus es indicativa de presencia de enfermedad 3, 4. En todos los casos un diagnóstico definitivo sobre la presencia o no de enfermedad relacionada con PCV2 debe incluir la detección del virus (antígenos virales o su ácido nucleico) asociado con un cuadro clínico y lesiones.



**Figura 2.** Comparación de secuencias obtenidas de muestras de cerdos. En el recuadro se muestran las secuencias obtenidas. Las secuencias de referencia muestran el número de ascensión al GenBank. En los cuadros se muestran las secuencias obtenidas del ADN amplificado de los virus detectados.



Estudios epidemiológicos de los genes del ORF2 del PCV2, se ha realizado para categorizar el PCV2 en diferentes genotipos según su genoma, siendo una herramienta útil para la caracterización de los distintos aislados de PCV [13]. Estudios previos indican que las variaciones genéticas del PCV2 deberían estar asociadas al origen geográfico más que con el tropismo celular o virulencia [14]. Desde la primera secuencia de PCV-2 descrita por Hamel y col. en 1999 [13], hasta el 2008, se han publicado aproximadamente 60 genotipos distintos de PCV2 en el GenBank, los cuales han sido aislados en distintos países y continentes. En un estudio realizado en China se distinguieron 9 patrones genéticos del marco de lectura ORF2 en el 59,9% de las muestras analizadas por PCR - RFLP provenientes de diferentes regiones geográficas del

país. El análisis filogenético de estos genotipos muestra que el PCV2 de mayor prevalencia en China comprende tres grupos diferentes [14]. Otro estudio de un brote de PMWS en Croacia, en cuatro pequeños criaderos de cerdos, se reportaron 4 secuencias de genomas de PCV2 que se agruparon en un origen común estrechamente relacionado con los genotipos de los aislados en Nueva Zelanda, Francia, China, UK y Eslovenia publicadas en GenBank [15].

El genoma de PCV2 se divide en 2 subgrupos o sub-genotipos en base a las secuencias de ORF2 a nivel de los nucleótidos 262-267 y los correspondientes aminoácidos 88-89. [16,17]. Pertenecen al grupo 1 (genotipo PCV2, sub - genotipo 1) los sub - genotipos que porten la secuencia CCCC/TG en esta posición, por ejemplo: cepas originarias de Nueva Zelanda, Tailandia y el Reino Unido. Mientras que cepas de Japón, Canadá, España, Taiwán y Sudáfrica poseen sólo la secuencia AAAATC (sub - genotipo 2). En contraste, cepas provenientes de Corea, Francia, Hungría, Austria, Alemania, Brasil y Estados Unidos comparten los 2 tipos de secuencias nucleotídicas (CCCC/TG y AAAATC) [18].

Los análisis filogenéticos de todas las secuencias de PCV2 reportadas en GenBank confirman que la secuencia del ORF2 de PCV2 es la más apropiada para separar los aislados del virus en sub - genotipos, sin que exista una asociación clara de sub - genotipos específicos con enfermedad o área geográfica [16]. Sin embargo, Fenaux y col. en 2004 [19], informaron que dos mutaciones de aminoácidos en ORF2 favorecen la replicación de PCV2 in vitro. Mutaciones en el ORF3 han demostrado alterar la patogenicidad de PCV2 in vivo [20], lo cual sugieren que la patogenicidad de PCV2 podría depender de su genotipo.

En el 2010, López y col. [10], realizaron un análisis de secuencias obtenidas de aislados de los estados Lara, Aragua y Yaracuy, demostraron que las secuencias de los aislados de los estados Aragua y Yaracuy, se clasificaron como PCV2 grupo 2 en la misma rama del árbol filogenético para las secuencias reportadas como subgrupo 2E, pero forman una sub - rama diferente dentro de los reportados como 2E. Estos dos grupos de secuencias de ORF2 PCV2 se clasifican dentro del grupo 2 aislados originalmente en Norte América [16], mostrando una homología del 96% para este grupo. Las secuencias de los aislados del estado Lara se clasificaron como PCV2 en la misma rama del árbol filogenético para las secuencias reportadas como sub - grupo 1A/B. Estas secuencias de ORF2 se clasifican dentro del grupo 1 aislados originalmente en Europa [16], evidenciando la movilidad de animales infectados que pueden introducir nuevos genotipos al país. Ese estudio representó el primer reporte de los genotipos de PCV2 que circulan en granjas porcinas de los estados

Aragua, Yaracuy y Lara, genotipos 1A/B y 2E.

En este trabajo, el análisis filogenético basado en el ORF2 de PCV2 permitió dibujar un árbol usando los 36 aislados detectados y las secuencias de referencia accesibles en bases de datos públicas (GenBank) (Figura 2). Las secuencias obtenidas de las muestras de cerdos beneficiados en matadero demostraron agruparse en los genotipos 1A/B y 2E, coincidiendo con lo que ya se había reportado en el 2010 [10]. Los análisis de secuencias obtenidas de aislados amplificados en sangre demostraron la capacidad diagnóstica de la PCR al obtener amplicones en las 36 muestras de sangre de los cerdos que también resultaron positivos a PCV2 en la PCR de los tejidos embebidos en parafina. A pesar de que la alta sensibilidad de la PCR disminuye su valor como prueba diagnóstica, la PCR es una herramienta importante en la detección de PCV2 en tejido de animales con sintomatología compatible a PCVAD; así como para llevar a cabo los estudios epidemiológicos a gran escala, que están permitiendo conocer la incidencia real de estos virus entre la población porcina, y clarificar su importancia real como patógeno concomitante. A medida que podamos profundizar en el estudio de los genotipos circulantes, podemos colaborar para llegar a un acuerdo en la nomenclatura internacional de genogrupos de PCV-2 que facilitaría enormemente la comparación entre los laboratorios de todo el mundo.

### CONCLUSIONES

En el presente estudio se logró determinar los genotipos circovirales de 36 muestras por medio de la secuenciación de los ácidos nucleicos de PCV2, y por medio de una PCR semi-anidada se pudo extraer ADN de PCV2 en sangre completa de animales sintomáticos con PCVAD, lo cual ayudará al diseño de estudios epidemiológicos en grandes poblaciones porcinas, sin la necesidad de recurrir al sacrificio de los animales sintomáticos. Estos estudios epidemiológicos son de utilidad para el establecimiento de estrategias para la vacunación de los diferentes grupos etarios dentro de una granja y así evitar que la enfermedad se disemine en una zona o región determinada.

### AGRADECIMIENTOS.

Se agradece del Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucleicos (CeSSAN) del IVIC. Este estudio se llevó a cabo con financiamiento del CDCHT - UCLA.

### BIBLIOGRAFÍA

[1] Allan G, McNeilly F, Meehan B, Ellis J, Connor T, McNair I, et al. A sequential study of experimental

infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2000; 47(2):81-94.

[2] Harding J, Clark E, Strokappe J. Postweaning multisystemic wasting syndrome: epidemiology and clinical presentation. *J Swine Health Prod* 1998; 6(6):249-254.

[3] Sorden S y Halbur P. How and why we diagnose PMWS and circovirus infection. In *Proceedings of PRRS and Type 2 Circovirus Workshop, Annual Meeting of the American Association of swine Veterinarians*, Kansas City, Ks 2002. Pp 33-37.

[4] Harding J y Clark E. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Swine Health Prod* 1997; 5(5):201-203.

[5] Ellis J, Krakowa S, Allan G, Clark E, Kennedy S. "The clinical scope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection has expanded since 1987": an alternative perspective. *Veterinary Pathology* 1999; 36(3):262-265.

[6] Ellis J, Krakowka S, Lairmore M, Haines D, Bratanich A, Clark E, et al. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1999; 11(1):3-14.

[7] Albina E, Truong C, Hutet E, Blanchard P, Cariolet R, L'Hospitalier R, et al. An experimental model for post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in growing piglets. *J Comp Pathol* 2001; 125:292-303.

[8] Ellis J, Clark E, Haines D, West K, Krakowka S, Kennedy S, Allan G. Infecciones concomitantes a Circovirus porcino tipo 2 en el campo. 2003. URL: <http://www.avancesentecnologiaporcina.com/> (Consultado: Febrero 24, 2008).

[9] Sogbe EM., Segalés J, Utrera V, Díaz C, Cano JP, Rodríguez-Cariño C, et al. Primer reporte en Venezuela del síndrome de emaciación multisistémico post-destete porcino. *Rev Fac Cs Vet UCV* 2003; 44(1):49-57.

[10] López JA. Caracterización molecular de Circovirus en granjas porcinas venezolanas. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Trabajo de ascenso para optar a la categoría de asociado en el escalafón del personal docente y de investigación de la UCLA 2010.

[11] Hamel AL, Lin LL, Sachvie C, Grudeski E, Nayar GP. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Can J Vet Res* Jan 2000; 64(1):44-52.

[12] Calsamiglia M, Segalés MJ, Quintana J, Rosell C, Domingo. Detection of Porcine Circovirus Types 1 and 2 in Serum and Tissue Samples of Pigs with and without Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome.

J Clin Microbiol 2002; 40(5):1848-1850.

[13] Hamel A, Lin L, Sachvie C, Grudeski E, Nayar G. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. Can J Vet Res 1999; 64(1):44-52.

[14] Wen L, Guo X, Yang H. Genotyping of porcine circovirus type 2 from a variety of clinical conditions in China. Vet Microbiol 2005; 110(1-2):141-146.

[15] Jemersic L, Cvetnic Z, Toplak I, Spicic S, Grom S, Barlic-maganja D, et al. Detection and genetic characterization of porcine circovirus type 2 (PCV-2) in pigs from Croatia. J Vet Sci 2004; 77(2):171-175.

[16] Olvera A, Cortey M, Segales J. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: Phylogeny and clonality. Virology 2007; 357(2):175-185.

[17] Cheung A, Lager K, Kohutyuk O, Vincent A, Henry S, Baker R, et al. Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. Arch Virol 2007; 152(5):1035-1044.

[18] Dong-jun A, In-soon R, Dae-sub S, Choi-kyu P, Bong-Kyun P. Phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS Korean pigs between 1999 and 2006. Virus Res 2007. 129(2):115-122.

[19] Fenaux M, Opriessnig T, Halbur PG, Elvinger F, Meng XJ. Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication in vitro and attenuated the virus in vivo. J Virol 2004; 78(24):13440-13446.

[20] Liu J, Chen I, Kwang J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. J. Virol 2005; 79(13):8262-8274.